

REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN EN CÉLULAS TUMORALES

Alfonso Dueñas González

BASES MOLECULARES DEL CANCER

Las propiedades que caracterizan a la célula maligna y por lo tanto al cáncer, son el resultado de la acumulación progresiva y sistemática de cambios en la información genética (Taja-Chayeb, Dueñas-Gonzalez 2002). Si bien es cierto que la pérdida, amplificación, translocación y mutación del DNA son eventos centrales en la etiopatogenia del cáncer, en los últimos años se han sucedido avances importantes en caracterizar el papel que desempeñan otros eventos bioquímicos fundamentales para el desarrollo y progresión del cáncer. Estudios recientes han descrito los *mecanismos epigenéticos de control transcripcional* que juegan un papel de gran importancia en la desactivación de genes responsables del crecimiento y diferenciación celular, y por lo tanto en el desarrollo de cáncer. Estos mecanismos de regulación de la expresión génica son la *metilación del DNA* y la *acetilación de histonas*.

METILACIÓN DEL DNA

La metilación del DNA ocurre en las islas CpG de las regiones reguladores de los genes, lo cual correlaciona con el estado de expresión de los mismos. Así, las islas estarán metiladas en genes de los tejidos en los cuales no se expresa el gen y desmetiladas en los genes localizados en tejidos en donde se expresen o en los genes constitutivos (Bird 1986). En los mamíferos, las islas CpG localizadas en la región promotora de los genes están invariablemente desmetiladas con excepción de los genes en el cromosoma X inactivo y en algunos genes que sufren el fenómeno de inactivación parental (Singer-Sam and Riggs 1993).

Los estudios iniciales sobre el papel de la metilación en la carcinogénesis se centraron en la primer DNMTasa clonada, o DNMT1. La región reguladora 5' del gen de la enzima tiene tres secuencias de reconocimiento para la proteína AP-1 (Rouleau et al, 1992), que es activada a través de la vía del oncogén ras (Angel and Karin 1991). Esta regulación podría explicar los niveles elevados de actividad de metiltransferasa o su RNA mensajero y la metilación de novo en líneas celulares de tumores in vitro. Otros datos experimentales del papel decisivo en la tumorigenesis de la hipermetilación del DNA lo constituyen la capacidad de la enzima DNA metiltransferasa, cuando es expresada mediante transfección de su gen en fibroblastos, de inducir metilación

genómica y transformación neoplásica (Wu et al., 1995), así como la capacidad de inhibir el fenotipo neoplásico de una línea celular de carcinoma adrenal mediante el uso de oligonucleótidos antisentido del gen de la enzima DNA metiltransferasa (Ramchandanni et al., 1997). Sin embargo, lo más probable es que el efecto tumorigénico no se deba a hipermetilación global sino específica sobre ciertos genes reguladores del crecimiento celular. Apoyando esta hipótesis, se ha observado metilación *de novo* afectando varios genes supresores de tumores tales como Rb, VHL, en retinoblastomas y carcinomas renales esporádicos respectivamente, así como en los genes p16, caderina E y otros genes en varios tumores (Santini et al 2001). Más recientemente se ha demostrado que la re-expresión del gen p16 en varias líneas celulares de carcinoma con delección de un alelo de p16 e hipermetilación del restante mediante exposición a 2-deoxi-5-azacitidina suprime el crecimiento de las mismas a través de un efecto independiente de la citotoxicidad propia del compuesto. Esta inhibición del crecimiento correlaciona estrechamente con la re-expresión del gen p16. Además, este efecto inhibitorio también es observado en líneas celulares que expresan normalmente p16, sugiriendo que otros genes supresores pudieran ser reactivados por la droga (Bender et al., 1998). Posteriormente se han clonado otras dos enzimas con actividad de DNA metiltransferasa, la DNMT3a y DNMT3b las cuales también desempeñan un papel en la tumorigenesis, especialmente la 3b que se ha visto implicada en la resistencia a drogas y supervivencia de las células malignas (Casillas et al., 2003).

ACETILACIÓN DE HISTONAS

La estructura en la que el DNA se organiza y empaqueta en el núcleo es la cromatina cuyo elemento primario estructural es el nucleosoma. Este está formado por un octámero de histonas que incluye dos de las proteínas histónicas: H2A, H2B, H3 y H4. El DNA organizado en el nucleosoma, arreglado alrededor de cada octámero en longitudes de aproximadamente 146 pares de bases no es accesible a la maquinaria de transcripción cuando las lisinas del extremo aminoterminal no sufren modificaciones, de hecho las cargas positivas de estos residuos interaccionan electrostáticamente con las cargas negativas de los grupos fosfato del DNA, lo que produce una organización más cerrada y compacta (Widom 1998).

El remodelamiento de la cromatina que regula la expresión génica, está determinado principalmente por la interacción de dos grupos

de enzimas, las *desacetilasas* y las *acetiltransferasas de histonas*. Se sabe que la acetilación está relacionada con la regulación de la transcripción genética. Los complejos activadores de la transcripción poseen funciones de acetiltransferasas de histonas. Por otro lado, los complejos co-represores poseen actividad de desacetilasas de histonas y confieren represión transcripcional. Así el proceso de acetilación de histonas es dinámico y los residuos de lisinas modificados hacia el extremo amino-terminal, son hiperacetilados con vidas medias de pocos minutos en zonas de cromatina transcripcionalmente activa. Para la histona H4, los residuos 5, 8, 12 y 16 son los sitios de lisinas que pueden acetilarse. La histona H3 tiene 4 residuos potenciales de modificación: éstos son el 14, 18, 23 y 27. Finalmente, para las H2A y H2B los sitios de acetilación son los residuos 5; así como el 5, 12, 15 y 20, respectivamente. La acetilación facilita la unión de los factores de transcripción a las secuencias de DNA en las zonas promotoras de los genes, fomentando una estructura abierta de la cromatina., así, con sólo 12 de ellas que estén acetiladas se eleva hasta 15 veces más la tasa de transcripción in vitro (Spencer VA, Davie JR 1999).

ALTERACIONES EPIGENÉTICAS Y CÁNCER

El silenciamiento transcripcional de genes supresores es quizá el mecanismo epigenético más importante que participa en el desarrollo y progresión de las neoplasias malignas. Si bien, no esta perfectamente claro si la metilación de los genes supresores es el mecanismo primario de la inactivación o simplemente actúa como un mecanismo adicional que refuerza el silenciamiento genético producido por la formación de una cromatina desacetilada y altamente compacta, lo más probable es que el silenciamiento sea gen específico, es decir, para algunos genes supresores el evento primario sea la metilación y para otros genes el evento primario sea la desacetilación de histonas. Lo que ha sido demostrado en condiciones experimentales es que existe un marcado sinergismo del efecto reactivante de la expresión genética entre un agente desmetilante y un inhibidor de desacetilasa de histonas. Por ejemplo, la combinación de 5-aza-2'-deoxicitidina –un agente desmetilante- y tricostatina A –un inhibidor de desacetilasas de histonas- producen una mayor reactivación de los genes RAR β y ER α en líneas celulares de cáncer de mama y dicha reactivación es mayor que con cualquiera de esos dos agentes por sí solos, además, ambos agentes producen mayor citotoxicidad que la lograda por cada uno de ellos de manera independiente (Bovenzi V & Momparler RL 2001). En otro estudio, la combinación de 5-aza-2'-deoxicitidina –un agente desmetilante- y depsipeptide –un inhibidor de desacetilasas de histonas- sinergizan para la activación de los genes *cadherina E* y *14-3-3 sigma* en las líneas de cáncer de mama Hs578T, MDA-MB-231 y MDA-MB-435, y la combinación también sinergiza la activación del gen supresor de tumores *TIMP3* en la línea MCF-7 (Gagnon et al 2003).

Dado que los datos experimentales sugieren que la manipulación farmacológica tendiente a re-expresar genes supresores en las enfermedades malignas podría tener un efecto terapéutico al afectar negativamente el crecimiento tumoral y modular

positivamente la respuesta a otros tratamientos, el paso a seguir es utilizar una terapia dirigida a la reactivación de los genes supresores inactivados transcripcionalmente, utilizando una combinación de inhibidores de la metilación e inhibidores de desacetilasas de histonas. Esta estrategia está siendo explorada por nuestro grupo en el tratamiento del cáncer.

REFERENCIAS

1. Angel P, Karin M. The rol of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1072: 129-157.
2. Bender CM, Pao MM, Jones PA. Inhibition of DNA methylation by 5-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines. *Cancer Res* 58: 95-101, 1998.
3. Casillas MA Jr, Lopatina N, Andrews LG, Tollefsbol TO. Transcriptional control of the DNA methyltransferases is altered in aging and neoplastically-transformed human fibroblasts. *Mol Cell Biochem.* 2003;252:33-43.
4. Bird AP. CpG islands and the function of DNA methylation. *Nature* 1986; 321: 209-213.
5. Bovenzi V, Momparler RL. Antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine and histone deacetylase inhibitor and their effect on the expression of retinoic acid receptor beta an estrogen receptor alpha genes in breast carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2001;48:71-6.
6. Gagnon J, Shaker S, Primeau M, Hurtubise A, Momparler RL. Interaction of 5-aza-2'-deoxycytidine and depsipeptide on antineoplastic activity and activation of 14-3-3sigma, E-cadherin and tissue inhibitor of metalloproteinase 3 expression in human breast carcinoma cells. *Anticancer Drugs.* 2003;14:193-202.
7. Ramchandani S, MacLeod AR, Pinard M, Von Hofe E, Szyf Moshe. Inhibition of tumorigenesis by a cytosine-DNA methyltransferase, antisense oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 684-689.
8. Rouleau J, Tanigawa G, Zsyf M. The mouse DNA methyltransferase 5' region. A unique housekeeping gene promoter. *J Biol Chem* 1992; 267: 7368-7377.
9. Santini V, Kantarjian HM, Issa JP. Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications. *Ann Intern Med.* 2001;134:573-86.
10. Singer-Sam J, Riggs AD. X chromosome inactivation and DNA methylation. *EXS* 1993; 64: 358-384.
11. Spencer VA, Davie JR. Control of histone modifications. *J Cell Biochem.* 1999;Suppl 32-33:141-8.
12. Taja Chayeb L, Dueñas Gonzalez A. *Biología Molecular del Cancer*, en: Angel Herrera Gomez, Martín Granados, Eds. *Manual de Oncología*, Mc Graw Hill Interamericana, Mexico, 23-34, 2003, ISBN 970-10-4109-7, 2da edición.
13. Widom J. Structure, dynamics, and function of chromatin in vitro. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1998;27:285-327.
14. Wu J, Issa JP, Herman J, Bassett DE, Nelking BD, Baylin SB. Expression of an exogenous eukaryotic DNA methyltransferase gene induces transformation of NHI3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8891-8895.